

Vorrichtung zur Herstellung von Trägerpolymermaterialien in Form von porösen Polymerperlen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines perlförmigen, vernetzten hydrophilen, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktiven Mischpolymerisats durch inverse Suspensionspolymerisation einer Monomerenphase. Die Erfindung betrifft weiterhin Trägerpolymermaterialien mit hoher Bindungskapazität für Penicillinamidase und niedriger Quellzahl sowie deren Verwendung

Stand der Technik

Poröse polymere Trägermaterialien für Proteine, insbesondere Enzyme sind hinreichend bekannt. Anwendungsgebiete liegen im medizinischen Bereich, z. B. bei der enzymatischen Spaltung von β -Lactamantibiotika wie Penicillin G zu 6-Aminopenicillan-Säure (6-APA) mittels der Penicillin-Acylase (Penicillinamidase). Wichtige Entwicklungsziele sind vor allem eine möglichst hohe Beladungskapazität, aber auch eine niedrige Quellbarkeit sowie möglichst geringe Restlösemittelgehalte. Halogenierte Lösungsmittel sollen bei der Herstellung grundsätzlich vermeiden werden.

DE-OS 22 37 316 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung perlförmiger, vernetzter Mischpolymerisate durch radikalische Polymerisation eines einen radikalbildenden Initiator enthaltenden Monomergemisches, das ein gegenüber biologischen Substanzen bindungsaktives Monomer, ein vernetzendes Comonomer und wenigstens ein weiteres Comonomer enthält, wobei das Monomerengemisch in einer unpolaren organischen Flüssigkeit zu Tröpfchen suspendiert und polymerisiert wird. Als unpolare organische Flüssigkeit eignen sich insbesondere aliphatische Kohlenwasserstoffe, vor allem solche mit 8 und mehr C-Atomen. In den Beispielen werden Mischungen aus n-Heptan und

Perchlorethylen eingesetzt. Das Verhältnis der Monomerenphase zur kontinuierlichen organischen Phase kann zwischen 1 : 1 und 1 : 10 liegen, jedoch werden Verhältnisse zwischen 1 : 1,5 und 1 : 4 bevorzugt.

DE-A 31 06 456 beschreibt ein gegenüber DE-OS 22 37 316 in Bezug auf die Bindungskapazität der Polymerperlen verbessertes Verfahren. Besonders hohe Bindungskapazitäten für Proteine, insbesondere für das Enzym Penicillin-Acylase (Penicillinamidase) werden erhalten, wenn die Trägerpolymere hohe Gehalte an vernetzenden Monomeren aufweisen und wenn die Monomerenphase, gebildet aus den Monomeren und dem Verdünnungsmittel, ein Lösungsmittelgemisch als Verdünnungsmittel enthält. Geeignete Gemische können z. B. Wasser/Methanol oder Formamid/Methanol sein. Monomere und Verdünnungsmittel liegen etwa im Verhältnis von 1 : 2,6 vor. Für die organische, kontinuierliche Phase wird ein Gemisch n-Hexan und Perchlorethylen verwendet. Das Verhältnis der Monomerenphase zur kontinuierlichen organischen Phase liegt in den Beispielen bei ca. 1 : 2,8. Bei Vernetzeranteilen von 50 Gew.-% im Monomerengemisch und der Verwendung von Wasser/Methanol als Verdünnungsmittel können Trägerpolymere mit einer Bindungskapazität, gemessen als Penicillinacylase-Aktivität, von bis zu 125 U/g erhalten werden.

Aufgabe und Lösung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde ein verbessertes Verfahren zur Herstellung perlförmiger, vernetzter Mischpolymerisate bereitzustellen. Dabei sollte auf die Verwendung halogenierter Lösungsmittel in der organischen kontinuierlichen Phase verzichtet werden und zugleich eine Bindungskapazität für das Enzym Penicillinamidase (EC 3.5.1.11) unter standardisierten Bedingungen (Beladung von 1g Trägerpolymermaterial mit 1530 Einheiten

Penicillinamidase) von mindestens 220 [U/g feucht] erreicht werden. Weiterhin sollte die Quellbarkeit der Polymerperlen in Wasser ausgedrückt in einer Quellungszahl (ml feucht / ml trocken) von nicht mehr als 1,5.

Die Aufgabe wurde gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines perlformigen, vernetzten hydrophilen, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktiven Mischpolymerisats durch inverse Perlpolymerisation einer Monomerenphase, die aus Monomeren und einem Verdünnungsmittel bestehen, wobei als Monomere

- a) 5 - 40 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wäßrige Lösungen bilden
- b) 30 - 50 Gew.-% radikalisch polymerisierbaren Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden kovalente Bindungen eingehen kann
- c) 20 - 60 Gew.-% hydrophile, vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen

mit der Maßgabe, daß sich a), b) und c) zu 100 Gew.-% addieren, enthalten sind und als Verdünnungsmittel ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 verwendet wird, wobei die Monomerenphase in einer kontinuierlichen Phase aus einem organischen Lösungsmittel aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoff mit 5 - 7

Kohlenstoffatomen zu Tröpfchen verteilt ist, wobei das Verhältnis Monomerenphase zu kontinuierlicher Phase 1 : 2,0 bis 1 : 4,0 beträgt, und in dieser Form in Gegenwart von einem Polymerisationsinitiator und eines Schutzkolloids radikalisch polymerisiert werden, mit der Maßgabe, daß das Verhältnis der Monomeren zum Verdünnungsmittel 1 : 1,7 bis 1 : 2,4 beträgt.

Unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein neuartiges Trägerpolymermaterial erhältlich, das eine Beladungskapazität für Penicillinamidase von mindestens 220 [U/g feucht], resultierend aus der Umsetzung von 1530 Einheiten Penicillin-Acylase mit 1 g Trägerpolymermaterial, und eine Quellzahl von höchstens 1,5 aufweist.

Es war nicht vorhersehbar, daß die Festlegung der verschiedenen Verfahrensparameter zueinander zu einer deutlich erhöhten Bindungskapazität für das Enzym Penicillinamidase führen würden und gleichzeitig aber die Quellbarkeit abnehmen würde. Überraschend war auch, daß unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die Auswahl des organischen Lösungsmittels aus den aliphatischen Kohlenwasserstoffen mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen auf den Einsatz halogener Kohlenwasserstoffe, wie Perchlorethylen, die bisher vor allem für den Dichteangleich der Phasen verwendet wurden, verzichtet werden kann.

Ausführung der Erfindung

Monomere

Um die Hydrophilie des Monomerengemischs zu gewährleisten, muß dieses zum überwiegenden Teil aus hydrophilen Monomeren bestehen. Unter hydrophilen Monomeren sind solche Monomere zu verstehen, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wäßrige Lösungen bilden und vorzugsweise keine ionischen oder durch Säure- oder Basenzusatz ionisierbaren Gruppen enthalten.

Die Monomere a) sind 5 - 40, 8 - 35, insbesondere 9 - 12 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wäßrige Lösungen bilden.

Als Monomere a) sind insbesondere Acrylamid und/oder Methacrylamid geeignet, wobei Methacrylamid bevorzugt wird. Weitere Beispiele sind Hydroxyalkylester von ungesättigten polymerisierbaren Carbonsäuren, wie Hydroxyethylacrylat und Hydroxyethylmethacrylat oder N-Vinylpyrrolidon.

Monomere b) sind 30 - 50, bevorzugt 35 - 45 Gew.-% radikalisch polymerisierbaren Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, bevorzugt einer Oxirangruppe (Epoxygruppe), die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden kovalente Bindungen eingehen kann. Insbesondere Oxirangruppen sind geeignet, um Liganden unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität zu binden.

Bevorzugte Monomere b) sind Glycidylmethacrylat und/oder Allylglycidylether. Besonders bevorzugt werden gleichzeitig beide Monomere in etwa gleichen Mengen eingesetzt.

Monomere c) sind 20 - 60, insbesondere 25 - 55, besonders bevorzugt 40 - 55 Gew.-% hydrophile, vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen.

Bevorzugte Monomere c) sind N,N'-Methylen-bis-Acrylamid oder N,N'-Methylen-bis-Methacrylamid. N,N'-Methylen-bis-Methacrylamid wird besonders bevorzugt. Gegebenenfalls können auch 0 - 10 Gew.-% weiterer vernetzender, radikalisch polymerisierbarer Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen eingesetzt werden. Geeignet sind hydrophile Di(meth)acrylate, wie z. B. Polyethylenoxid-Di(meth)acrylate.

Die Monomere a), b) und c) addieren sich jeweils zu 100 Gew.-%.

Verdünnungsmittel

Die Monomerenphase besteht aus den Monomeren a) bis c), die in einem Verdünnungsmittel, das ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 sein muß, gelöst sind. Besonders günstige Mischungsverhältnisse für Methanol und Wasser liegen bei 1 : 1,2 bis 1 : 2,5, insbesondere bei 1 : 1,3 bis 1 : 1,7.

Verhältnis Monomere zu Verdünnungsmittel

Besonders kritisch ist das Verhältnis Monomere zu Verdünnungsmittel. Dieses muß im Bereich von 1 : 1,7 bis 1 : 2,4, besonders bevorzugt im Bereich von 1,9 bis 2,1 liegen.

Kontinuierliche Phase

Als kontinuierliche Phase eignet sich ein organisches Lösungsmittel, das ein aliphatischer Kohlenwasserstoff mit 4 bis 7 C-Atomen ist. Bevorzugt ist n-Heptan und besonders bevorzugt Cyclohexan.

Verhältnis Monomerenphase/kontinuierlicher Phase

Das Verhältnis von der Monomerenphase zur kontinuierlichen Phase, gebildet durch das organische Lösungsmittel muß bei 1 : 2,0 bis 1 : 4,0, bevorzugt zwischen 1 : 2,8 bis 1 : 3,3.

Weitere Verfahrensbedingungen

Als weitere Bestandteile enthält die suspendierte Monomerphase in an sich bekannter Weise Polymerisations-Initiatoren, bevorzugt sind schwefelfreie Initiatoren, besonders bevorzugt ist 4,4'-Azobis-(4-Valeriansäure), sowie Schutzkolloide (Emulgatoren), wie z. B. ein Mischpolymerisat aus 95 Teilen n-Butylmethacrylat und 5 Teilen 2-Trimethylammoniummethacrylat-Chlorid mit Molekulargewichten (Gewichtsmittel) im Bereich von 30.000 bis 80.000.

Die Perlpolymerisation (auch als Suspensionspolymerisation bezeichnet) wird ansonsten in bekannter Weise ausgeführt, indem z. B. die kontinuierliche

Phase und dem Schutzkolloid vorgelegt wird und die Monomerenphase, in der sich auch der Initiator befindet unter Rühren z. B. bei 40 bis 60 °C in der organischen Phase verteilt wird und anschließend auf 60 - 70 °C erhitzt wird. Das Wasser/Methanol-Gemisch kann z. B. über einen Zeitraum von 6 Stunden nahezu vollständig azeotrop ausgekreist werden. Man läßt den Ansatz für ca. 3 - 5 Stunden zu Ende reagieren und kühlt anschließend auf Raumtemperatur ab. Die entstandenen Perlen werden abgesaugt und z. B. für 12 Stunden im Vakuum getrocknet. Alternativ dazu können die Perlpolymerisate auch abfiltriert und mit Wasser gewaschen werden. Bevorzugt wird eine Trocknung in einem Wirbelschichttrockner vorgenommen, da sich auf diese Weise Lösungsmittelreste besonders effektiv entfernen lassen.

Die erhaltenen Polymerperlen (= Trägerpolymermaterial) haben eine Größe im Bereich von 50 bis 500 µm, insbesondere von 120 bis 250 µm.

Unter der Bindungskapazität wird diejenige enzymatische Aktivität verstanden, die sich bei maximaler Beladung des Trägerpolymermaterials mit einem bestimmten Enzym erreichen läßt. Ein wichtiges Anwendungsgebiet des erfindungsgemäßen Trägerpolymermaterials ist die Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicillan-Säure (6-APA) mittels gebundener Penicillinamidase aus *E. coli*. Die Bindungskapazität wird ausgedrückt als Penicillinamidase-Aktivität in Units pro g Trägerpolymerperlen [U/g feucht]. Die Bindungskapazität der erfindungsgemäßen Trägerpolymerperlen beträgt bei dieser Meßmethode mindestens 220 [U/g feucht].

Die Quellbarkeit der Polymerperlen in Wasser wird ausgedrückt durch die Quellungszahl [ml feucht / ml trocken]. Die erfindungsgemäßen Trägerpolymerperlen weisen eine Quellungszahl von nicht mehr als 1,5 auf.

Verwendungen der erfindungsgemäßen Trägerpolymermaterialien

Die erfindungsgemäßen Trägerpolymermaterialien können zur kovalenten Bindung von Liganden mittels der vorhandenen Oxirangruppen in Rühr- oder Durchflußreaktoren eingesetzt werden. Dies kann z. B. durch Anlagerung von Proteinen, insbesondere Enzymen, aus konzentrierten Lösungen über kovalente Bindung unter Beibehaltung ihrer biologischen Aktivität erfolgen. Weiterhin können auch Peptide, Aminosäuren, β -Lactamantibiotika, Lipide, Nucleotide, Polynukleotide, niedermolekulare nucleophile Verbindungen oder metallorganische Verbindungen mit den Oxirangruppen der Trägerperlen umgesetzt werden.

Die mit Liganden beladenen Polymerperlen können in an sich bekannter Weise zur stereospezifischen Synthese von chiralen Substanzen, wie Aminosäuren (d-Phenylalamin, p-Hydroxy-d-phenylalanin, l-tert.-Leucin) oder Arzneimitteln, z. B. von Ibuprofen, eingesetzt werden. Ebenso werden sie als Träger eingesetzt in der enzymatischen Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicillinansäure (6-APA), Cephalosporin G zu 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure (7-ADCA) oder Cephalosporin C zu 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA). Das Verfahren ist beschrieben in DECHEMA Jahrestagung 1996 - Kurzfassungen, Bd. 1, DECHEMA e.V.. Weitere Anwendungsgebiete sind spezifische enzymatische Synthesen an Substraten wie z. B. obigen Spaltprodukten zu Amoxicillin und Ampicillin. Ein weiteres Anwendungsgebiet sind Synthesen von Feinchemikalien oder Grundprodukten für chemische Synthesen (z. B. Apfelsäure). Die Polymerperlen können auch in der Separationstechnik zur Adsorptionchromatographie oder Gelpermeationschromatographie verwendet werden. Zur spezifischen Adsorption können die Polymerperlen mit

Immunglobulin-Fractionen aus Antiseren oder mit monoklonalen Antikörper beladen werden. Als weiteres Einsatzgebiet ist die Verwendung des mit Enzymen oder Antikörpern beladenen Trägerpolymermaterials als Adsorbens in der extrakorporalen Therapie, in der pathogene bzw. toxische Substanzen aus Vollblut entfernt werden, zu nennen.

Beispiele

(Die folgende Bestimmungsmethode ist dem Fachmann auf den Gebiet poröser Trägerpolymermaterialien an sich geläufig und wird nur der Vollständigkeit halber aufgeführt)

Bestimmung der Bindungskapazität für Penicillinamidase (= Penicillin G-Acylase) aus *E. coli* (EC 3.5.1.11)

a) Kovalente Bindung von Penicillinamidase an das Trägerpolymermaterial

1 g Trägerpolymermaterial werden zu 1530 Units Penicillinamidase in 5 ml sterilem 1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 gegeben und für 48 h bei 23 °C inkubiert.

Anschließend werden die Polymerperlen auf eine Fritte aus gesintertem Glas (Porösität 2 oder 3) gegeben und zweimal mit entionisierten Wasser und anschließend zweimal mit 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, mittels Absaugens auf der Fritte gewaschen. Das Feuchtgewicht der erhaltenen, mit Penicillin-Acylase beladenen Perlen wird bestimmt.

b) Bestimmung der Bindungskapazität

250 - 300 mg feuchtes mit Penicillinamidase gekoppeltes Trägerpolymermaterial (Polymerperlen) werden in 20 ml einer 2 %-igen Penicillin-G-Lösung in 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, bei 37 °C gegeben. Unter gleichmäßiger Rührung

erfolgt eine Titration frei gewordener Phenylelessigsäure mit 0,5 M NaOH bei einem konstantem pH-Wert von 7.8 für die Dauer von 10 Minuten, wobei der Verbrauch an NaOH aufgezeichnet wird.

Anschließend werden die Polymerperlen wie unter a) über eine Glasfritte mittels Durchsaugen von 20 ml 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, gewonnen und die Messung zweimal wiederholt.

c) Berechnung der Bindungskapazität

Der lineare Bereich der Meßkurven (üblicherweise der Bereich von 1 - 5 min) wird für die Berechnung zugrunde gelegt und auf ein 10 min Intervall extrapoliert. Die Bindungskapazität wird als Penicillinamidase Einheiten pro g feuchten Trägerpolymermaterials (U/g feucht) angegeben. Eine Einheit entspricht einem μmol hydrolysiertem Penicillin G pro Minute ($\mu\text{mol}/\text{min}$); 1 l 0,5M NaOH ist dabei äquivalent zu 500 μmol hydrolysiertem Penicillin G. (Der Wassergehalt des Trägerpolymermaterials ist in etwa konstant und kann daher vernachlässigt werden.)

Beispiele 1 - 3Übereinstimmende Versuchsbedingungen in den Beispiele 1 - 3:

In einem 2 l Rührkolben mit Thermometer, Wasserabscheider, Rückflußkühler, Stickstoffeinleitungsrohr werden ein organisches Lösungsmittel, 3 g eines Mischpolymerisats aus 95-Teilen n-Butylmethacrylat und 5 Teilen 2-Trimethylammoniummethacrylat-Chlorid als Schutzkolloid und 5 g Trockeneis vorgelegt. Unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff wird bei 50 °C eine Monomerenphase bestehend aus Wasser und Methanol und im Verhältnis 1 : 1,5 als Verdünnungsmittel, sowie

10 g Methacrylamid,
20 g Allylglycidylether,
20 g Glycidylmethacrylat und
50 g Methylen-bis-methacrylamid

sowie

2 g 4,4'-Azobis-4-cyanovaleriansäure (als Polymerisationsinitiator)

in der organischen Phase verteilt und anschließend zum Sieden bei 65 - 70 °C erhitzt. Der Ansatz wird für ca. 6 h inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die entstandenen Polymerperlen werden abgesaugt, gewaschen und im Wirbelschichttrockner getrocknet. Anschließend wird die Bindungskapazität für Penicillinamidase [U/g feucht] und die Quellzahl bestimmt [ml feucht/ml trocken] bestimmt.

Die wesentlichen Versuchsparameter und die Ergebnisse der Beispiele 1 - 3 sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

| | Beispiel 1 (erfindungsgemäß) | Beispiel 2 (Vergleichsbeispiel) | Beispiel 3 (Vergleichsbeispiel) |
|--|--|------------------------------------|---|
| Organisches Lösungsmittel (kontinuierliche Phase) | 952 g Cyclohexan | 669 g Cyclohexan | 530 g n-Heptan + 530 g Perchlorethylen |
| Monomere insgesamt | 100 g | 100 g | 100 g |
| Verdünnungsmittel | 80 g Methanol + 120 g Wasser (= 1 : 1,5) | 263 g Formamid | 264 g Formamid |
| Monomere + Verdünnungsmittel (Monomerenphase) | 300 g | 363 g | 364 g |
| Verhältnis Monomere/ Verdünnungsmittel | 1 : 2 | 1 : 2,63 | 1 : 2,64 |
| Verhältnis Monomerenphase/ kontinuierliche Phase | 1 : 3,2 | 1 : 1,8 | 1 : 2,9 |
| Bindungskapazität für Penicillinamidase (1530 U) [U/g feucht] | 252 | 194 | 192 |
| Quellzahl [ml feucht/ ml trocken] | 1,3 | 4,0 | 3,9 |

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines perlförmigen, vernetzten hydrophilen, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktiven Mischpolymerisats durch inverse Perlpolymerisation einer Monomerenphase, die aus Monomeren und einem Verdünnungsmittel bestehen, wobei als Monomere

a) 5 - 40 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wäßrige Lösungen bilden

b) 30 - 50 Gew.-% radikalisch polymerisierbaren Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden kovalente Bindungen eingehen kann

c) 20 - 60 Gew.-% vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen

mit der Maßgabe, daß sich a), b) und c) zu 100 Gew.-% addieren, enthalten sind und als Verdünnungsmittel ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 verwendet wird, wobei die Monomerenphase in einer kontinuierlichen Phase aus einem organischen Lösungsmittel aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoff mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen zu Tröpfchen verteilt ist, wobei das Verhältnis Monomerenphase zu kontinuierlicher Phase 1 : 2,0 bis 1 : 4,0 beträgt, und in dieser Form in Gegenwart von einem Polymerisationsinitiators und eines

Schutzkolloids radikalisch polymerisiert werden, mit der Maßgabe, daß das Verhältnis der Monomeren zum Verdünnungsmittel 1 : 1,7 bis 1 : 2,4 beträgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Monomere

a) Acrylamid und/oder Methacrylamid

b) Glycidylmethacrylat und/oder Allylglycidylether

c) Methylen-bis-Acrylamid oder Methylen-bis-Methacrylamid

eingesetzt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als organisches Lösungsmittel Cyclohexan verwendet wird.

4. Trägerpolymermaterial herstellbar nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Bindungskapazität für Penicillinamidase aus *E. coli* von mindestens 220 [U/g feucht], resultierend aus der Umsetzung von 1530 Einheiten Penicillinamidase mit 1 g Trägerpolymermaterial, und eine Quellzahl von höchstens 1,5 aufweist.

5. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 4 zur Bindung von Proteinen.

6. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 5 zur Bindung von Enzymen
7. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 5 zur Bindung von Antikörpern
8. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 4 in der Chromatographie
9. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 4 zur Synthese von Arzneistoffen
10. Verwendung des Trägerpolymermaterials gemäß Anspruch 4 zur stereospezifischen Synthese von chiralen Substanzen.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/00635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C08F2/18 C08F220/56 C08F220/00 C08F220/32 C12N11/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08F C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------------|
| X | <p>US 4 511 694 A (KRAEMER DIETER ET AL) 16 April 1985 cited in the application * Column 1, Line 50 - Column 2, Line 59 ; Column 3, Line 5 - Column 4, Line 21 * see column 4, line 42-59 -----</p> <p>US 4 247 643 A (KRAEMER DIETER ET AL) 27 January 1981 see column 4, line 45 - column 5, line 3; claims 1-14 -----</p> | <p>1-7,9,10</p> <p>1-10</p> |
| Y | <p>US 5 294 491 A (GOELDNER ERNST ET AL) 15 March 1994 * Example A ; Column 4, Line 51 - Column 5, Line 10 * see abstract -----</p> | <p>1-10</p> |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May 1999

Date of mailing of the international search report

28/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hammond, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00635

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 4511694 A | 16-04-1985 | DE 3106456 A | 07-10-1982 |
| | | CA 1202748 A | 01-04-1986 |
| | | EP 0058767 A | 01-09-1982 |
| | | JP 1614475 C | 15-08-1991 |
| | | JP 2041526 B | 18-09-1990 |
| | | JP 57153010 A | 21-09-1982 |
| US 4247643 A | 27-01-1981 | DE 2732301 A | 25-01-1979 |
| | | AT 358516 B | 10-09-1980 |
| | | AT 424978 A | 15-02-1980 |
| | | EP 0000486 A | 07-02-1979 |
| | | JP 1432587 C | 24-03-1988 |
| | | JP 54019901 A | 15-02-1979 |
| | | JP 62039997 B | 26-08-1987 |
| US 5294491 A | 15-03-1994 | DE 9013137 U | 23-01-1992 |
| | | AT 97023 T | 15-11-1993 |
| | | DE 59100586 D | 16-12-1993 |
| | | EP 0482339 A | 29-04-1992 |
| | | JP 4247236 A | 03-09-1992 |

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00635

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C08F2/18 C08F220/56 C08F220/00 C08F220/32 C12N11/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C08F C12N C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ^a | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|---|--------------------|
| X | US 4 511 694 A (KRAEMER DIETER ET AL) 16. April 1985 in der Anmeldung erwähnt * Spalte 1, Zeile 50 - Spalte 2, Zeile 59 ; Spalte 3, Zeile 5 - Spalte 4, Zeile 21* siehe Spalte 4, Zeile 42-59 --- | 1-7,9,10 |
| Y | US 4 247 643 A (KRAEMER DIETER ET AL) 27. Januar 1981 siehe Spalte 4, Zeile 45 - Spalte 5, Zeile 3; Ansprüche 1-14 --- | 1-10 |
| Y | US 5 294 491 A (GOELDNER ERNST ET AL) 15. März 1994 * Beispiel A ; Spalte 4, Zeile 51 - Spalte 5, Zeile 10 * siehe Zusammenfassung ----- | 1-10 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Mai 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hammond, A

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00635

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 4511694 A | 16-04-1985 | DE 3106456 A | 07-10-1982 |
| | | CA 1202748 A | 01-04-1986 |
| | | EP 0058767 A | 01-09-1982 |
| | | JP 1614475 C | 15-08-1991 |
| | | JP 2041526 B | 18-09-1990 |
| | | JP 57153010 A | 21-09-1982 |
| ----- | | | |
| US 4247643 A | 27-01-1981 | DE 2732301 A | 25-01-1979 |
| | | AT 358516 B | 10-09-1980 |
| | | AT 424978 A | 15-02-1980 |
| | | EP 0000486 A | 07-02-1979 |
| | | JP 1432587 C | 24-03-1988 |
| | | JP 54019901 A | 15-02-1979 |
| | | JP 62039997 B | 26-08-1987 |
| ----- | | | |
| US 5294491 A | 15-03-1994 | DE 9013137 U | 23-01-1992 |
| | | AT 97023 T | 15-11-1993 |
| | | DE 59100586 D | 16-12-1993 |
| | | EP 0482339 A | 29-04-1992 |
| | | JP 4247236 A | 03-09-1992 |
| ----- | | | |